

KÅRE BERGLUND

Studier
över faktorer som betinga
CORTISONETS EFFEKT
på antikroppsbildningen

STANFORD LANE MEDICAL
LIBRARY SAN FRANCISCO

Diss. med.
Stockholm. Karolinska Institutet
21 APR. 1956

STOCKHOLM 1956



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Från

STATENS BAKTERIOLOGISKA LABORATORIUM (*chef: prof. G. Olin*)
OCH REUMATOLOGISKA AVDELNINGEN (*bitr. överläkare: docent B. Olhagen*)
VID MEDICINSKA KLINIKEN (*chef: prof. N. Svartz*)
KAROLINSKA SJUKHUSET, STOCKHOLM

Studier över
faktorer som betinga
cortisonets effekt
på antikroppsbildningen

Av KÅRE BERGLUND

Till

BITT, JONAS och PER

Föreliggande uppsats utgör en sammanfattning av följande publikationer av författaren:

I—IV. Studies on factors which condition the effect of cortisone on antibody production:

- I. 1. The significance of time of hormone administration in primary hemolysin response. Acta path. et microbiol. Scandinav. **38**:1956.
- II. 2. The significance of the dose of antigen in primary hemolysin response. Ibid. **38**:1956.
- III. 3. The significance of time of hormone administration in primary agglutinin response to *S. typhi* H. Ibid. **39**:1956.
- IV. 4. The significance of the particle size of the antigen. Ibid **39**:1956.
- V. Effect of splenectomy on antibody formation in cortisone treated rats. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 1956.
- VI. Hemolysin response in the rat after a single intraperitoneal injection of sheep erythrocytes. Acta path. et microbiol. Scandinav. **38**:1956.
- VII. Absence of late effect of cortisone on serum globulin metabolism in the rat. Acta endocrinol. 1956.

Vid hänvisningar till ovanstående publikationer kommer de romerska siffrorna att användas. Arabiska siffror hänvisar till allmänna referensförteckningen.

INTRODUKTION

Från 1920-talet fram till omkring 1950 intresserade man sig för frågan om antikroppsbildningen på något sätt reglerades av binjurebarkens aktivitet. Flera undersökare hävdade att så var fallet, medan andra icke kunde bekräfta deras fynd (se översikter i 31, 2). Sammanfattande kan man säga att man icke lyckades övertygande visa att adenalektomi eller tillförsel av binjurebarkextrakt påverkar antikroppsbildningen.

Sedan 1949 har forskningen mera varit inriktad på att studera effekten av stora, icke fysiologiska doser binjurebarksteroider eller adrenocorticotropt hormon. Detta sammanhänger med att dessa hormoner under denna tid kommit till utbredd klinisk användning som farmakologiska medel. Gynnsam effekt iaktogs bl. a. vid sjukdomstillstånd där antikroppsbildningen anses ha patogenetisk betydelse — t. ex. allergiska och vissa hämatologiska sjukdomar. Man fann också att infektioner kunde påverkas i ogynnsam riktning av dessa hormoner. Infektioner är dessutom en komplikation vid behandling med dessa medel (översikt i 20). Dessa kliniska observationer har kraftigt stimulerat intresset för antikroppsbildningens förhållande under tillstånd av förhöjd corticosteroidkoncentration i organismen. Ett stort antal experimentella arbeten har även publicerats.

Det står nu klart att cortison och hydrocortison under vissa betingelser verkar reducerande på koncentrationen av cirkulerande antikroppar efter injektion av antigen på de vanligaste experimentdjuren (gnagare). På grund av denna effekt har dessa hormoner liksom röntgenbestrålning blivit instrument i försök att analysera betingelserna för och förloppet av de processer som leder till antikroppsbildning.

Under de sista åren har emellertid de biologiska förutsättningarna för sådana experiment kommit i en annan dager. Vid analys av binjurevenblod hos två gnagare, råtta och kanin, har man funnit huvudsakligen corticosteron (compound B) och inga eller små mängder 17-hydroxicorticosteroider (hydrocortison eller cortison) (5, 21). Människa (21), katt och apa (5) däremot producerar sannolikt huvudsakligen hydrocortison. Situationen har ytterligare komplicerats sedan man på kanin kunnat visa att under stimulation av binjurebarken med ACTH eller under stress kan detta djur producera avsevärda mängder hydrocortison (compound F) (21). Någon liknande undersökning på råtta har ej publicerats. Dock vet man att långvarig ACTH-behandling framkallar samma rubbningar som cortison hos detta djur (18). Huruvida cortison generellt sett verkar annorlunda på djur som huvudsakligen producerar compound B än på sådana, vars binjuror väsentligen bildar compound F, vet man inte. Sedan länge har gnagare dominerat som försöks-

djur inom immunologien. Något material för jämförelser beträffande cortisonets effekt på antikroppsbildningen hos compound B och compound F-*"producenter"* finns därför inte. Att cortison ej givit hämning av antikropps- bildningen hos människa (undantag se I) kan bero på att de använda doserna varit för små (20). Olika hetererna i steroidproduktion nödvändiggör emellertid ökad försiktighet när det gäller att överföra erfarenheter från cortison- behandling av gnagare till människa.

Oaktat dessa allmän-biologiska reservationer är det av praktiska skäl sannolikt att studier av cortisonets effekt på antikropps- bildningen även i framtiden till stor del kommer att göras på gnagare. En genomgång av den föreliggande litteraturen visar att endast få och begränsade studier har ägnats de betingelser under vilka hormonet utövar denna effekt. För fortsatt experi- mentell forskning är det av praktisk betydelse att konditionerande faktorer klarlägges. Härigenom kan även administration av cortison och hydrocortison göras till ett smidigare instrument för grundforskning över antikropps- bildningsprocessen.

I en serie arbeten (I—V) har författaren sökt att mera systematiskt belysa några faktorer som har betydelse när man vill framkalla en hämning av anti- kropps- bildningen med cortison. Dessa undersökningar har icke direkt syftat till att analysera mekanismen bakom cortisonets effekt. För tolkningen av vissa resultat ansågs det dock vara av vikt att om möjligt avgöra huruvida den observerade antikropps- reduktionen endast var en manifestation av en generell rubbning av serumglobulinmetabolismen (VII).

I det följande ges en kort redogörelse för de resultat som uppnått jänte kommentarer: Frågor om den biologiska angreppspunkten för cortison kom- mer endast att beröras i den mån som resultaten kan tänkas ge bidrag till orientering av fortsatt forskning inom detta ännu ej klarlagda område. Intet försök har gjorts att analysera om cortisonets verkan utövas direkt på den antikropps- bildande vävnaden eller indirekt via en rubbning av funktionen i endokrina organ.

Allmänt om försöksbetingelserna. I många försök har det av statistiska orsaker varit önskvärt att använda ett stort antal individer (VI). Av praktiska skäl har författaren därför valt ett litet experimentdjur — råtta. Djuren har i samtliga försök varit av hankön och vägt omkring 200 g. Immuniseringen har alltid skett genom en enda injektion av ett antigen som icke kunnat föröka sig. Detta ger det enklast möjliga testobjekt för studier av antikropps- bildningen in vivo — primary response (se vidare under moment 3). Som antigen har använts: 1) fårblodkroppar, 2) *S. typhi* vaccin rikt på H-antigen eller 3) ett renat lågmolekylärt cilieantigen från *S. typhi*. Antigeninjektio- nerna, som alltid givits intraperitonealt, har haft en standardiserad volym: 1 ml/100 g kroppsvikt för 1) och 0,5 ml/100 g för 2) och 3). Antigendosens storlek kommer härefter att uttryckas med koncentrationen. Dagen för anti- geninjektionen kallas "dag 0", dagen före antigeninjektionen "dag -1" och dagen efter antigeninjektionen "dag +1" etc.

Antikropparna har bestämts som hämolysiner mot fårblodkroppar (VI) respektive H-agglutinin mot *S. typhi* H (III). Författaren har kontrollerat

att serum från cortisonbehandlade djur inte påverkar antigen-antikroppsreaktionen vid hämolysintitrering (se även 25).

I ett tidigare publicerat försök (4) hade cortison framkallat en signifikant reduktion av hämolysinsvaret på dag + 5. Två sera i den cortisonbehandlade gruppen visade då obetydlig hämolys i lägsta serumspädningen (1:12,5). Två djur i kontrollgruppen visade 50 procent hämolys i serumspädning 1:100. Dessa sistnämnda sera blandades nu i lika delar med varsitt av de förstnämnda (negativa ur cortisongruppen). Vid ny titrering överensstämde titern hos dessa blandsera med den hos respektive kontrollserum.

Cortison har givits en gång dagligen intramuskulärt som en suspension i fysiologisk koksalt av cortisonacetatet (Cortone, Merck & Co., Inc. eller Cortal, Organon/Pharmacia). Dagsdosen har då ej annat angivits varit 4 mg/100 g kroppsvikt (=standarddosen). Hormontillförsel före och efter antigeninjektionen betecknas med "förbehandling" respektive "efterbehandling". Till efterbehandlingsdagar räknas även dagen för antigeninjektionen då hormonet alltid injicerats efter antigenet. Standarddosen och i ännu högre grad dubbla denna dos framkallar en viktminskning som ökar med behandlingens längd. Fjorton dagars behandling med standarddosen gav en vikt-reduktion (i förhållande till kontroller) på cirka 30 procent. Detta fenomen är väl känt och har tillskrivits reduktion av lymfoida organ samt andra delar av "carcass" medförande bl. a. förlust av kväve (23, 30).

Cortisonbehandling av råttor med doser av denna storleksordning ger en ökad frekvens av infektioner framförallt i brösthåla och bukhåla (17). I föreliggande material förlorades enstaka djur till följd av infektioner, vanligen lokaliserade till lungor och pleura. I den mån serum från sådana djur titrerats på antikroppar visade erhållna värden ingen tendens att skilja sig från övriga värden i gruppen. Antikroppstitrar från infekterade djur har därför inte uteslutits vid den statistiska behandlingen av resultaten. Konklusioner beträffande effekten av cortisonbehandling har baserats på statistisk bearbetning av materialet. För positiva slutsatser har krävts en signifikansnivå på högst en procent ($P < 0,01$). Tillförsel av cortison har aldrig medfört en stegring av antikroppssvaret. "Effekt av cortison" kommer i fortsättningen att beteckna en signifikant reduktion av antikropps-nivån.

KONDITIONERANDE FAKTORER FÖR DEN ANTIKROPPSREDUCERANDE EFFEKTEN AV CORTISON

1. CORTISONDOSENS STORLEK

Föreliggande resultat (I, II, III) talar för att man under hänsynstagande till vissa tidsfaktorer (se nedan) i regel kan finna en cortisondos som ger en reduktion av antikroppssvaret. Den minsta dos som haft effekt i författarens arbeten är 4 mg/100 g eller 40 mg/kg. Denna dos är enorm om man jämför den med kliniska doser. Emellertid har det visats att råttan normalt har en hög steroidproduktion i sina binjurar. För att återställa normal arbetsförmåga ("work performance test") hos adrenalektomerade råttor krävdes närmare 20 mg cortison per kg och 24 tim. (19). Vid direkt mätning av steroidsekretionen i binjurevenblod har råttan visat sig ha en i förhållande till vikten betydligt större produktion än andra undersökta djur (5). Sålunda var kaninernas värden 2,3—16 gånger lägre. Detta fenomen har en intressant parallellitet till de lägsta cortisondoserna som har effekt på antikroppsbyggningen hos dessa djur. Hos kaninen har man fått effekt med 2 mg/kg (14), det vill säga en dos som är 20 gånger mindre än den minsta verksamma i författarens råttförsök. Om det finns en kvantitativ, positiv korrelation mellan nivån hos den fysiologiska steroidproduktionen och den lägsta cortisondos som ger effekt på antikroppsbyggningen kan nu inte avgöras.

Det kan tilläggas att marsvin synes kräva lika stora doser cortison som råttan för en hämning av antikroppsbyggningen (13, 10)

2. ANTIGENDOSSENS STORLEK

I försök med fårblodkroppar som antigen visade det sig att hämolysinbyggningens känslighet för cortison varierade med antigenens storlek (3). Vid en liten dos (0,32-procentig suspension) uppnåddes effekt med endast tre dagars behandling om den startade två dagar före antigeninjektionen (I). Vid en cirka 30 gånger större dos (10-procentig suspension) måste förbehandlingen förlängas till cirka 8 dagar för att framkalla en reduktion av antikroppssvaret (II). Samma tendens kunde spåras i försök där cortisonbehandlingen startades efter antigeninjektionen. Vid en liten antigenens dos (0,032-procentig suspension) erhöles effekt med dubbla standarddosen cortison (8 mg/100 g) under sex dagar. Vid en 1 000 gånger större antigenens dos (32-procentig suspension) registrerades däremot ingen signifikant effekt av samma dos cortison under åtta dagar. — Ett liknande resultat har under enahanda immuniseringsbetingelser uppnåtts i musförsök (25).

Orsaken till att antikroppsbyggningen är mindre påverkbar vid högre antigenens doser är oklar. Den ytligt sett enklaste mekanismen är att den minsta effektiva totalmängden cortison (given i standarddos eller mera) är kvantita-

tivt, positivt korrelerad till antigendosens storlek. Innebörden av ett sådant fenomen förblir dunkelt så länge man inte känner naturen hos den rubbning som cortisonet framkallar i någon eller några av de processer som leder till antikroppsproduktion (se vidare moment 3).

Författaren har emellertid framkastat möjligheten att skillnaden i hormonverkan vid små och stora antigendoser kan ha en kvalitativ orsak (II). Denna tanke väcktes först av observationen att hämolysinsvaret på en stor intraperitoneal fårblodkroppsdos sannolikt har ett tidigare maximum än antikropps svaret på en liten intraperitoneal dos (VI). *Taliaferro & Taliaferro* (32) har på kanin visat att efter en intravenös injektion av fårblodkroppar bildade mjälten hämolysiner tidigare, mera intensivt och mera kortvarigt än extraspleniska antikropps bildningslokaler. Det föreföll därför tänkbart att det tidigare hämolysinmaximum som iaktogs hos råttor efter en stor antigen dos (VI) kunde bero på att mjälten här svarade för en mera betydande del av antikroppsproduktionen. När en stor mängd fårblodkroppar ges intraperitonealt kunde en avsevärd del därav nå cirkulationen och därmed mjälten. Vid mindre mängder av detta antigen skulle flertalet blodkroppar fångas av fagocyter innan de nådde cirkulationen.

Denna hypotes stödes av resultatet av mjältexstirpationsförsök. Borttagande av mjälten före en intraperitoneal injektion av en liten mängd fårblodkroppar (1 ml 0,5-procentig suspension) medförde ingen signifikant förändring av hämolysinsvaret (29, 36). Mjältexstirpation en dag efter antigeninjektionen (1 ml/100 g av en 0,32-procentig suspension) gav samma resultat.

Mjältexstirpation utfördes på en grupp om fyra råttor. En kontrollgrupp om fyra djur blev "sham operated" (beträffande försökstekniken se V). På dag + 5 visade de mjältexstirperade en något lägre genomsnittlig hämolysintiter (differens $0,62 \pm 0,74$).

Vid en stor fårblodkropps dos (10-procentig suspension) däremot medförde splenektomi en reduktion av antikropps svaret på dag + 4 och + 5 (V).

Det kunde beräknas att på dag + 4 hade kontrollerna bildat minst 2,5 gånger mera antikroppar än splenektomerade (motsvarande undre 99-procentiga konfidensgränsen för differensen). Om splenektomi inte förändrar antikropps bildningen utanför mjälten (29, 36) betyder detta att mjälten på dag + 4 bildat minst 1,5 gånger mera antikroppar än övriga produktionsorter. Vid senare observationstillfällen (dag + 5 och + 8) kunde man icke visa, men heller icke utesluta en sådan dominans av mjältens antikropps bildning.

Dessa resultat antyder att det under tidigaste delen av hämolysinsvaret kan finnas en skillnad beträffande mjältens relativa andel i antikroppsproduktionen vid små och stora intraperitoneala fårblodkropps doser. Men detta förhållande förklarar icke cortisonets olika effektivitet vid de två antigennivåerna såvida man inte antar att hämolysin bildningen i mjälten är mindre känslig för hormonet än den extraspleniska produktionen. För att pröva denna möjlighet utfördes splenektomi en dag efter en intraperitoneal injektion av en stor fårblodkropps dos (10-procentig suspension) på tidigare cortisonbehandlade djur (V). Det kunde visas att på femte och åttonde dagen efter antigeninjektionen hade cortisonet framkallat signifikant större effekt hos splenektomerade djur än hos "sham operated". Antikropps bildningen hos splenektom-

merade djur efter denna stora antigen-dos syntes vara lika påverkbar av cortison som hämolysinproduktionen efter en liten fårblodkroppsdos (0,32-procentig suspension) hos intakta.

Detta resultat kan tolkas på två sätt:

1. Antag att mjälten alltså producerar huvudparten av de hämolysiner som mättes i sera från femte och åttonde dagen efter antigeninjektionen. Resultatet kan då förklaras av att mjältens hämolysinbildning har en större resistens mot cortison än den extraspleniska. Det betyder också att cortisonkänsligheten hos den extraspleniska hämolysinbildningen inom det studerade området är tämligen oberoende av antigen-dosen.

2. Alternativt är det möjligt att större delen av de hämolysiner som bestämdes i sera från dag +5 och +8 emanerar från extraspleniska produktionsorter. Resultatet måste då tolkas så att splenektomi har minskat resistensen mot cortison hos antikropps-bildningen i dessa organ. Med andra ord: Mjälten producerar eller innehåller en faktor som inhiberar effekten av cortison på antikropps-bildningen i andra organ. Denna möjlighet får ett visst stöd av observationen att en intraperitoneal injektion av homologa mjältceller kan upphäva effekten av cortison på hämolysinbildningen efter en intraperitoneal injektion av fårblodkroppar (4).

Sammanfattande kan det sägas att vid intraperitoneal injektion av fårblodkroppar är den resulterande hämolysinbildningen svårare att påverka vid större antigen-doser än vid mindre. Föreliggande undersökningar har inte kunnat visa om detta är ett kvantitativt fenomen eller om det beror på att mjälten producerar en stor del av hämolysinerna vid en stor fårblodkroppsdos, men ej vid en mindre, och att antikropps-bildningen i detta organ är relativt resistent mot cortison.

Detta arbete belyser inte betydelsen av injektionsväg för antigenet. Det bör dock nämnas att om det skulle visa sig att antikropps-bildningen i olika organ förhåller sig olika mot cortison, kan platsen för antigenets deposition i organismen ha betydelse för effekten av behandling med detta hormon.

3. TIDEN FÖR CORTISONTILLFÖRSELN

(längd och lokalisation i förhållande till antigeninjektionen).

För att underlätta framställningen har författaren använt några beteckningar som måste definieras: — Tiden före och efter antigeninjektionen kallas förantigenperioden respektive efterantigenperioden. — Med den "potentiellt antikropps-bildande apparaten" menas de cellulära element som under inflytande av ett antigen deltar i de "processer som leder till antikroppsproduktion". Dessa processer tänkes inkludera fagocytos (ingestion och digestion av antigenet), upptagande av antigenpartiklar i potentiellt äggviteproducerande celler och slutligen syntes av antikroppar. De processer som föregår syntesen av antikroppar kommer i fortsättningen att sammanfattande betecknas som "assimilatoriska processerna".

Två olika antigen har använts för tidsstudier: Fårblodkroppar och ett *S. typhi* H vaccin. De har givits i följande doseringar: fårblodkroppar: 1 ml/100 g av en 0,032—0,32-procentig suspension, *S. typhi* H: 0,5 ml/100 g av en suspension med $3,2 \cdot 10^7$ — $3,2 \cdot 10^8$ bakterier per ml. Dessa doseringsområden ligger vid eller strax ovan de minsta doser som ger tillräckliga antikroppssvar för att medge registrering av en signifikant hämmande effekt av cortison. Vid dessa fårblodkropps-doser synes antikropps-bildningen väsentligen försiggå i extraspleniska lokaler. Detta gäller även den lägsta dosen av *S. typhi* H* vid vilken de noggrannaste studierna av den "tidiga perioden" (se nedan) skett. Mjältens roll vid den något högre dosen av detta antigen ($3,2 \cdot 10^8$ bakterier per ml) har ej undersökts. Någon skillnad i känslighet för cortison hos antikropps-bildningen vid de två dosnivåerna (*S. typhi* H) har ej iakttagits.

De båda antigenen framkallar antikroppssvar som är mycket olika. Dessa kan enklast beskrivas genom den kurva som uttrycker koncentrationen av cirkulerande antikroppar (logaritmisk skala) som en funktion av tiden. Efter injektion av fårblodkroppsantigenet börjar hämolysiner uppträda på dag + 3 eller dag + 4. Kurvan stiger sedan tämligen brant till omkring dag + 7 då ett maximum nås (VI). I denna första fas dominerar sålunda syntes över katabolism. Under de två följande veckorna avtar antikroppshalten tämligen snabbt med en halveringstid av omkring 3 dagar (jfr. kurvor i VI). Detta värde skiljer sig inte från det man funnit vid studier av katabolismen av gammaglobulin (26) och antikroppar (VII) hos råttor. I denna fas av hämolysinsvaret dominerar sålunda katabolism av antikroppar. Kurvförloppet tyder dock på att en viss syntes försiggår även i detta skede (VI).

Efter en injektion av *S. typhi* H-antigenet uppträder agglutiner på dag + 3 eller dag + 4. Kurvan stiger sedan snabbt till ett relativt högt värde på dag + 6 (III) (dominerande syntes). Sedan kvarstår den några veckor på samma nivå eller stiger eventuellt något. Ännu på dag + 42 har ingen markerad nedgång av antikroppshalten observerats. Under åtskilliga veckor håller sålunda syntes och katabolism av antikroppar ungefär jämna steg.

Tidsstudierna kan lämpligen indelas i två tidsavsnitt inom vilka cortison-behandling givits och antikroppshalten uppmätts.

1. *En tidig period*, som omfattar dels en tid före antigeninjektionen och dels de första 5—6 dagarna efter denna. Det senare avsnittet täcker olika faser av de processer som resulterar i den koncentration av antikroppar som kan mätas på dag + 5 och dag + 6: a) en period om 3—4 dagar av huvudsakligen "assimilatoriska processer", b) en följande fas där det tillkommer en livlig syntes av antikroppar samt en, ännu i bakgrunden trädande, katabolism av dessa. Den titer som uppmättes vid slutet av perioden utgör ett relativt mått på storleken av den tidigaste delen av antikroppssvaret (de första 2—3 dagarna av mätbar antikroppsproduktion).

* Två dagar efter en intraperitoneal injektion av ett *S. typhi* H vaccin ($3,2 \cdot 10^7$ bakterier per ml) utfördes mjältexstirpation på en grupp om sju råttor och "sham operation" på en grupp om 7 djur. På dag + 6 förelåg ingen skillnad i genomsnittlig H-agglutinititer mellan grupperna (differens 0.00).

2. *En sen period*, som omfattar tiden dag + 6 till dag + 42. Råttans korta hämolysinsvar lämpar sig föga för sådana studier (I). Framställningen skall därför begränsas till de undersökningar som bedrivits med *S. typhi* H som antigen. Som ovan påpekats håller under detta avsnitt syntes och katabolism av antikroppar ungefär jämna steg.

En mellanställning intar de tillfällen när effekten av en behandling, given under "tidiga perioden", mätts vid olika tidpunkter inom "sena perioden". Dessa resultat kommer att behandlas för sig.

Resultaten av tidsstudierna har framlagts utförligt i tidigare arbeten (I, III). De skall här redovisas i koncentrerad form.

"Tidiga perioden"

Behandlingseffekter under "tidiga perioden" har alltid registrerats vid slutet av denna. De mest detaljerade studierna har utförts med fårblodkroppar som antigen (I). Resultaten kan schematiskt sammanfattas sålunda.

1. Den kortaste effektiva behandlingsperioden omfattade två dagars förbehandling (dag — 2 och dag — 1) och en dags efterbehandling (dag 0).

2. Behandling på dagar före (upp till 5) eller efter (upp till 4) denna period kunde icke visas öka denna effekt.

3. Behandling som gavs enbart före dag — 2 eller efter antigeninjektionen hade ingen signifikant effekt.

Enbart förbehandling var verksam såvida den inkluderade dag — 2 och dag — 1. Ytterligare behandling på dag 0 och dag + 1 ökade denna effekt. Det har följaktligen icke kunnat bevisas att cortison hade effekt vid administration på andra dagar än dag — 2 t. o. m. dag 0. Denna tre-dagarsperiod täcker ett kort avsnitt av förantigenperioden och ett ännu kortare av "assimilationsfasen".

En mera summarisk analys av "tidiga perioden" har utförts med *S. typhi* H som antigen (III). Schematiskt kan resultaten uttryckas sålunda:

1. Den kortaste effektiva behandlingsperioden omfattade sex dagars förbehandling (dag — 6 t. o. m. dag — 1).

2. Ytterligare behandling under de tre följande dagarna (dag 0 t. o. m. dag + 2) ökade inte effekten.

3. Enbart efterbehandling (upp till sex dagar) hade ingen signifikant effekt även om den kombinerades med 2—4 dagars förbehandling.

Undersökningarna har alltså icke kunnat visa att cortison som tillföres efter antigeninjektionen har effekt inom "tidiga perioden". De sex administrationsdagar som synes nödvändiga för en effekt täcker enbart ett avsnitt av förantigenperioden.

Sammanfattning och kommentarer: Undersökningsresultaten vid de båda antigenen överensstämmer i följande avseenden:

1. Förutsättning för effekt av cortison var en viss behandling under förantigenperioden.

2. Behandling under senare delen av "assimilationsfasen" (efter dag 0) eller under den period då antikroppssyntes sker kunde icke visas ha effekt.

Detta resultat talar för att cortisonet utövar sin effekt på den "potentiellt

antikroppsbyggande apparaten" före dag + 1. Innebörden av den *minsta nödvändiga förbehandlingsperioden* vid de båda antigenen (två dagar resp. sex dagar) är oklar. Det har tidigare framhållits (1) att det kristalliniska cortisonacetatet resorberas relativt långsamt från intramuskulära depåer. Vid upprepade injektioner kan detta medföra en viss kumulation av depåcortison. Sekretionen av löst cortison från injektionsställena bör öka i proportion därtill. Det är därför tänkbart att förbehandlingen endast innebär en ackumulation av cortison, vilken ger den nödvändiga vävnadskoncentrationen vid tiden för antigeninjektionen. Det är emellertid även möjligt, och beträffande den längre förbehandlingstiden (sex dagar) mera sannolikt, att cortisonet börjar påverka den "potentiellt antikroppsbyggande apparaten" redan någon tid före introduktionen av antigenet.

Effekten av cortison, hydrocortison och ACTH på organ som innehåller potentiellt antikroppsbyggande vävnad — lymfkörtlar och mjälte — är väl känd. På mus (7,28), råtta (1,28) och kanin (22,16) har man iakttagit involution av lymfatiska organ. Genom lys sker tidigt en reduktion av antalet lymfocyter (7,28) och vid fortsatt behandling med större doser synes utarmningen av dessa celler bibehållas genom hämmad produktion (1,7). Då lymfocyternas roll i antikroppsbyggnaden ännu är oklar (8) ger dessa observationer i och för sig ingen förklaring till cortisonets effekt vid "primary response". Det har emellertid hävdats att cortisonets hämmande verkan på antikroppsproduktionen skulle stå i direkt relation till graden av reduktion av den "totala vävnad" som är tillgänglig för denna process (16). Denna hypotes har grundats på studier av cortisonets effekt på antikroppsproduktionen i dränerande poplitealymfkörteln efter injektion av antigenet i en bakfot på kanin. Hormonbehandlingen reducerade cellinnehållet i lymfkörteln sex gånger. Dessa celler, liksom motsvarande celler från obehandlade djur, överfördes i lika mängd till intakta kaniner. I ett par försök registrerades ingen skillnad i den resulterande antikroppsproduktionen hos dessa. I andra försök gav dock celler från cortisonbehandlade djur lägre titrar. Den tolkning som givits dessa försök skär så att säga alla lymfoida celler över en kam och räknar dessutom ej med möjligheten av rent funktionella rubbningar.

Man vet alltså inte med säkerhet var i den "potentiellt antikroppsbyggande apparaten" som cortisonet utövar den verkan som medför sänkt förmåga till antikroppsproduktion. Ej heller vet man vilket eller vilka led i den kedja av reaktioner, som leder till antikroppsbyggnad, som i och med denna skada blir rubbade. Den bristande effekten av cortisontillförsel efter dagen för antigeninjektionen talar dock för att denna dysfunktion skall sökas i ett tidigt avsnitt av den "assimilatoriska" fasen. Oklarheten om vad som sker i detta skede reducerar värdet av de upplysningar som erhållits genom histologiska studier av den inflammatoriska reaktionen på antigenet. Det enda iakttagbara skeende som direkt kan låsas fast till den "assimilatoriska" fasen är fagocytosen. Vid en diskussion av cortisonets effekt på detta fenomen är det lämpligt att skilja mellan två funktioner av fagocyterna, ingestion och digestion. De flesta studierna över binjurebarkhormonens förhållande till fagocytosen gäller ingestionen. Resultaten är motsägande. Man har funnit

ökad, minskad eller oförändrad ingestion efter tillförsel av binjurebarkhorm eller ACTH (se översikter 20, 33). Det är sålunda för närvarande inte möjligt att generellt hänföra cortisonets hämmande effekt på antikroppsbildningen till ett bristfälligt upptagande av antigen i fagocyter.

I några få undersökningar har man studerat cortisonets effekt på digestionen av antigenet. Fyra olika antigen—erythrocyter (22), heterologt protein (22), tuberkelbakterier (24) och viridans streptokocker (6) — visade betydligt förlängd persistens i fagocyterna under cortisonbehandling. Dessa iakttagelser, som ännu veterligt icke blivit motsagda, torde vara bland de väsentligaste bidragen till kunskapen om cortisonets effekt på de processer som leder till antikroppsbildning. De synes väl förklara en retardation av antikroppssvaret.

”Sena perioden”

Det har visats att cortisontillförsel under minst nio dagar av denna period kan sänka antikropps-nivån (III). Denna effekt blev manifest ganska sent — några dagar efter avslutandet av behandlingen — men när den väl var etablerad visade den ingen tendens att försvinna under de ytterligare två veckor som observerats. Det har inte kunnat demonstreras att cortisonet är mindre effektivt under ”sena” än under ”tidiga perioden” (III).

Dessa behandlingsresultat ger i och för sig ingen antydning om vilken process som cortisonet påverkar. Man kan tänka sig att hormonet hämmar syntesen och/eller accelererar katabolismen av antikroppar. I kaninförsök har det visats att cortison icke påverkar katabolismen av antikroppar (11, 14). Författaren har kommit till samma resultat i försök på råttor under betingelser som överensstämmer med dem som gällt vid ovannämnda studier av ”sena perioden” (VII). — Är det då sannolikt att syntesen av antikroppar påverkats primärt? Författaren har undersökt möjligheten att antikroppsreduktionen endast är en manifestation av en allmän hämning av globulinsyntesen (VII). Cortison tillfördes råttor under 14 dagar. Med hänsyn till den sena manifestationen av cortisonets effekt på antikropps-nivån bestämdes serumproteinfraktionerna (papperselektrofores) först 17 dagar efter behandlingens slut. Cortisonet hade då inte framkallat någon signifikant ändring av β - eller γ -fraktionerna. Cortisonets hämmande effekt på globulinsyntesen skulle emellertid kunna vara begränsad till den aktuella antikroppsproduktionen. Mot denna förklaring talar erfarenheten från ”tidiga perioden” att cortisontillförseln under de första dagarna av antikropps-syntes icke hade någon signifikant, omedelbar effekt.

Om man därför antar att cortison ej påverkar syntesen primärt måste dess verkan utövas genom en rubbning i förutsättningarna för att syntes-stadiet över huvud skall uppnås.

Det utdragna agglutinin-svaret på *S. typhi* H vaccinet med tendens till ökning av titernivån under de första veckorna kan vara ett uttryck för att antigenet metaboliseras långsamt. Det är sålunda möjligt att ”assimilatoriska” processer försiggår under flera veckor efter antigeninjektionen. Erfarenheterna från ”tidiga perioden” talar för att skadan träffar ett tidigt led av dessa processer. Därför kan man vänta en viss latensperiod innan skadan

kommer till uttryck i reducerad antikroppsproduktion. Denna reduktion kommer dessutom att under en viss ytterligare tid döljas av tidigare producerade antikroppar, vilka elimineras med en halveringstid på 3—4 dagar (VII). Dessa båda omständigheter torde väl förklara att cortisonets effekt under "sena perioden" kommer så sent till uttryck.

Som tidigare påpekats har effekten av en behandling, som givits under "tidiga perioden", även mätts vid olika tidpunkter inom "sena perioden". När det gäller fårblodkroppsantigenet (dag + 7, + 9 eller + 10) inträdde inga kvalitativa förändringar av de behandlingseffekter som registrerats vid "tidiga periodens" slut (I). När det gäller *S. typhi* H-antigenet syntes de effekter som registrerats vid slutet av "tidiga perioden" snarare öka vid senare undersökningstillfällen. Det gällde speciellt de djur som förbehandlades sex dagar och efterbehandlades tre dagar. Effekten på antikropps-nivån föreföll vara störst vid sista undersökningstillfället, 25 dagar efter behandlingens slut (tabell 7, III). Detta resultat antyder att cortisonet hade framkallat en definitiv reduktion av antikroppssvaret på det givna antigenet. Hormonets verkan under "tidiga perioden" kunde förklaras genom en retarderad digestion av antigenet i fagocyterna (se ovan). För att förklara den persistierande effekten efter hormonbehandlingens slut räcker dock icke denna hypotes. Man kan här tänka sig att digestionen är kvalitativt defekt och att antalet effektiva antikroppsinitierande antigenenheter därigenom decimeras.

4. ANTIGENETS ART

De resultat från studier av "tidiga perioden", som relaterats i moment 3, antyder att cortisonets effekt på antikropps-bildningen kan variera med antigenets kemiska natur. Den väsentliga skillnaden i effekt vid de två antigenen kan enklast uttryckas genom de redan meddelade (moment 3) kortaste effektiva behandlingsperioderna:

1. För fårblodkroppsantigenet: förbehandling under två dagar samt efterbehandling under en dag (I).

2. För bakteriella antigenet: förbehandling under sex dagar men ingen efterbehandling (III).

Denna skillnad kan även studeras genom jämförelser mellan lika eller praktiskt taget lika behandlade grupper i försök med respektive antigen (exp. 2:I, exp. 1:III). En variansanalys av detta material visade även signifikant skillnad i cortisoneffekt vid de två antigenen.

Immuniseringen har i båda fallen utförts med en liten intraperitoneal antigen-dos, som sannolikt väsentligen har givit upphov till extrasplenisk antikropps-bildning. Det är emellertid omöjligt att säga om dessa antigenstimuli är av samma storleksordning (viktsmängd) vare sig med avseende på de ämnen som givit upphov till hämolysiner och H-agglutinin-er eller beträffande respektive antikroppssvar (III). Det kan sålunda invändas att olikheter i dessa avseenden kan betinga skillnaden i effekt av cortison vid de två antigenen. Som det framgår av moment 2 är det dock ännu inte klar-

lagt huruvida det finns en korrelation mellan antigenmängd och resistens mot cortison hos antikroppsbildningen.

Det är emellertid möjligt att effekten av cortison på antikroppsbildningen är beroende av antigenets kemiska natur (III). Olikheter i kemisk konstitution hos antigener kan tänkas medföra modifikationer i de processer som leder till antikroppsproduktion: 1) Antigenets metaboliska degradation kan få kvalitativt olika förlopp. 2) Antigenets nedbrytning kan ske med olika hastighet (se moment 3). 3) Antikroppsytelsen kan förete kvalitativa skillnader ledande till antikroppsäggvita med olika fysikalisk-kemiska egenskaper (9, 27). — Dylika variationer i metabolismen av antigen och antikroppar kan möjligen betinga skillnader i känslighet för cortison.

5. ANTIGENETS PARTIKELSTORLEK

Det har tidigare hävdats (15) att cortison har en större effekt på antikroppsbildningen vid ett antigen med en liten partikelstorlek än vid ett storpartikulärt. Författaren har gjort försök att ytterligare belysa denna fråga (IV). Antigenet — cilieprotein i *S. typhi* — gavs i två olika aggregationsformer, antingen som avdödade bakterier eller som det renade proteinet i en jämförelsevis lågmolekylär form. I vaccinet beräknas cilierna ha en sedimentationskonstant av storleksordningen 100—300 S (12). Det injicerade vaccinet bestod väsentligen av partiklar som kunde centrifugeras ned vid 3 000 varv/min. under 30 min. Det renade proteinet dekomponerades genom sur "hydrolys" (35). Detta "hydrolyserade" antigen innehöll inga partiklar som kunde centrifugeras ned vid 27 000 varv/min. under 30 min. Cilier från *S. paratyphi B* och *Proteus vulgaris* har efter samma dekomposition visat en sedimentationskonstant på 2—3 S (35, 34). De "hydrolyserade" ciliepartiklarna från den senare bakterien beräknades ha en molekylvikt av storleksordningen 40 000 (34). — Djuren immuniserades med en intraperitoneal engångsinjektion. Två olika cortison doseringar prövades: 1) sex dagars förbehandling + två dagars efterbehandling, 2) två dagars förbehandling + två dagars efterbehandling. Antikropparna bestämdes på vanligt sätt som H-agglutinin.

Den långa behandlingen hade effekt på antikroppssvaret på båda antigenen. På dag + 13 hade den korta behandlingen reducerat agglutininsvaret på det "hydrolyserade" proteinet medan titernivån hos bakterieimmuniserade djur icke påverkats signifikant. En statistisk analys visade emellertid ingen signifikant skillnad i effekt av cortison vid de båda antigenen. Detta resultat kan ha påverkats av en faktor vars betydelse dock undandrar sig bedömande. Det kan nämligen inte uteslutas att någon del av de injicerade "intakta" cilierna kan ha hunnit dekomponeras innan de blivit fagocyterade. Om detta skett i någon större utsträckning kan det ha bidragit till att utsudda skillnaden mellan de båda antigenen.

Sammanfattande kan det sägas, att varken tidigare undersökningar (15) (diskuterat i IV) eller den här redovisade har givit stöd för hypotesen att cortisonets effekt på antikroppsbildningen varierar med antigenets partikelstorlek.

SAMMANFATTNING

I en serie undersökningar på råtta har författaren sökt belysa några faktorer som betingar cortisonets reducerande effekt på antikroppsproduktionen efter en intraperitoneal antigeninjektion (fårblodkroppar eller *S. typhi* H vaccin). Resultaten kan kondenseras som följer:

1. *Cortisondosens storlek.* Den minsta dagsdos cortison som framkallade antikroppsreduktion var 4 mg per 100 g kroppsvikt. Denna dos har använts i de försök vilkas resultat sammanfattas nedan.

2. *Antigendosens storlek.* Vid immunisering med fårblodkroppar syntes cortisonets reducerande effekt på hämolysinsvaret variera med antigendosens storlek. Vid en stor antigen dos fordrades en mera intensiv behandling än vid en mindre. Orsaken till detta har inte kunnat klarläggas. En möjlig förklaring är att vid en stor fårblodkropps dos svarar mjälten för en betydande del av hämolysinproduktionen och att detta organs antikropps bildning är mera resistent mot cortison än extraspleniska produktionsorter.

3. Tiden för cortisontillförseln.

a) För att påverka de första 2—3 dagarnas antikroppsproduktion måste cortisonet tillföras under några dagar före antigeninjektionen. Hormontillförsel efter dagen för antigeninjektionen gav ingen signifikant effekt på denna tidiga del av antikropps svaret. Detta talar för att cortisonet påverkar en tidig fas av antikropps bildningsprocessen och mot att mekanismen för syntes av antikroppar influeras.

b) Administration av cortison efter dagen för antigeninjektionen (*S. typhi* H vaccin) framkallade en sänkning av antikroppsnivån, som blev manifest först i ett senare avsnitt av antikropps svaret, d. v. s. efter en viss latenstid. En särskild undersökning gav ej stöd för att denna effekt var ett uttryck för en allmän reduktion av serumglobulinkoncentrationen eller för en accelererad katabolism av antikropps äggvita.

Det förefaller möjligt att cortisonets verkan vid både tidig (a) och sen (b) administration är uttryck för en rubbning av samma fas av de processer som leder till antikropps bildning. I studierna med *S. typhi* H som antigen syntes denna skada vara irreversibel.

4. *Antigenets art.* Vid små antigen doser var den kortaste effektiva behandlingsperioden längre vid immunisering med *S. typhi* H än vid immunisering med fårblodkroppar. Denna skillnad kan tänkas bero på en olikhet i a) intensiteten hos antikropps produktionen, b) kvantiteten tillfört antigen, eller c) kemisk konstitution hos antigenet.

5. *Antigenets partikelstorlek.* Variation av antigenets (cilieproteinet i *S. typhi*) partikelstorlek gav ingen signifikant förändring av cortisonets reducerande effekt på antikropps svaret.

*T*ill följande, vilka på olika sätt bidragit till detta arbetes fullbordan, ber jag att få uttrycka min tacksamhet:

Professor Gunnar Olin, som välvilligt ställt sitt laboratoriums stora resurser till mitt förfogande och genom sitt stöd bidragit till att uppgiften kunnat slutföras inom rimlig tid.

Docent Astrid Fagraeus, som väckte mitt intresse för experimentell immunologisk forskning, och som varit min lärare och kritiker under hela arbetet. Hennes tveklösa hjälpsamhet har varit ett utomordentligt stöd.

Professor Sven Gard, som på ett generöst sätt utövat en stimulerande och skolande kritik vid planläggning av försöken och vid värdering av deras resultat.

Docent Börje Olhagen och professor Thorolf Packalén för värdefull kritik och instruktion.

Professor Nanna Svartz och docent Eric Jonsson, min förutvarande chef, vilka givit välvilligt stöd.

Fil. lic. Nils Blomqvist, som stimulerande och instruktivt väglett i försöksplanering och statistisk materialbehandling.

Fröken Gunvor Lewander, fröken Birgitta Thorburn † och fröken Harriet Karlén, vilka givit plikttrogen och skicklig hjälp med laboratoriearbetet.

Doktor Reiner Arnold för hjälp med engelskan.

Firma Erik Lindblom & Co., Stockholm, för generösa gåvor av cortison. — Riksföreningen mot reumatism för ekonomiskt stöd.

REFERENSER

1. *Baker, B. L., Ingle, D. J. & Li, C. H.*: Am. J. Anat. 88: 313: 1951.
2. *Barber, M. & Delauny, A.*: Post-Grad. M. J. 28: 351: 1952.
3. *Berglund, K. & Fagraeus, A.*: Proceed. VIth Internat. Congr. Microbiol., Rome, 1953, vol. 2, sect. VI—VII, sid. 231.
4. *Berglund, K. & Fagraeus, A.*: Nature 177: 233: 1956.
5. *Bush, I. E.*: J. Endocrinol. 9: 95: 1953.
6. *Clawson, B. J. & Nerenberg, S. T.*: J. Lab. & Clin. Med. 42: 746: 1953.
7. *Dougherty, T. F.*: Physiol. Rev. 32: 379: 1952.
8. *Ehrich, W. E.*: Klin. Wchnschr. 33: 315: 1955.
9. *Enders, J. F.*: In *Tullis, J. L.*: Blood cells and plasma proteins, New York, Academic Press, Inc., 1953.
10. *Fischel, E. E., Kabat, E. A., Stoerk, H. C., Skolnich, M. & Bezer, A. E.*: J. Allergy 25: 195: 1954.
11. *Fischel, E. E., Stoerk, H. C. & Björneboe, M.*: Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 77: 111: 1951.
12. *Gard, S.*: Arkiv för Kemi 19 A, nr 21: 1945.
13. *Germuth, F. G., Ottinger, B. & Oyama, J.*: Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 80: 188: 1952.
14. *Germuth, F. G., Oyama, J. & Ottinger, B.*: J. Exper. Med. 94: 139: 1951.
15. *Hanan, R. & Oyama, J.*: Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 85: 373: 1954.
16. *Harris, T. N., Harris, S. & Farber, M. B.*: J. Immunol. 72: 161: 1954.
17. *Ingle, D. J.*: Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 79: 184: 1952.
18. *Ingle, D. J., Prestrud, M. C. & Li, C. H.*: Am. J. Physiol. 166: 165: 1951.
19. *Ingle, D. J., Prestrud, M. C. & Nezamis, J. E.*: Am. J. Physiol. 166: 171: 1951.
20. *Kass, E. H. & Finland, M.*: Ann. Rev. Microbiol. 7: 361: 1953.
21. *Kass, E. H., Hechter, O., Mou, T. W. & Lurie, M. B.*: Arch. Int. Med. 96: 397: 1955.
22. *Kass, E. H., Kendrick, M. J. & Finland, M.*: Ann. New York Acad. Sc. 56: 737: 1953.
23. *Kochakian, C. D. & Robertson, E.*: J. Biol. Chem. 190: 481, 495: 1951.
24. *Lurie, M. B., Abramson, S., Heppleston, A. G. & Dannenberg, A. M.*: Federation Proc. 11: 475: 1952.
25. *Newsom, S. E. & Darrach, M.*: Canad. J. Biochem. Physiol. 32: 372: 1954.
26. *Oeff, K.*: Ztschr. f. d. ges. exper. Med. 123: 309: 1954.
27. *Oncley, J. L.*: In *Tullis, J. L.*: Blood cells and plasma proteins, New York, Academic Press, Inc., 1953.
28. *Ringertz, N., Fagraeus, A. & Berglund, K.*: Acta path. et microbiol. Scandinav. Suppl. 93: 44: 1952.
29. *Rowley, D. A.*: J. Immunol. 64: 289: 1950.
30. *Silber, R. H. & Porter, C. C.*: Endocrinology. 52: 518: 1953.
31. *Taliaferro, W. H.*: Ann. Rev. Microbiol. 3: 1949.
32. *Taliaferro, W. H. & Taliaferro, L. G.*: J. Infect. Dis. 87: 37: 1950.
33. *Timiras, P. S.*: Acta endocrinol. Suppl. 11: 1953.
34. *Weibull, C.*: Biochim. biophys. acta 2: 351: 1948.
35. *Weibull, C. & Tiseliuss, A.*: Arkiv för Kemi 20 B, nr 3: 1945.
36. *Wissler, R. W., Robson, M. J., Fitch, F., Nelson, W. & Jacobson, L. O.*: J. Immunol. 70: 379: 1953.

